

**PENGESANAN VIRUS HEPATITIS C DENGAN KAEDAH  
TRANSKRIPSI BERBALIK-TINDAKBALAS RANTAIAN  
POLIMERASE ELISA: PREVALEN HEPATITIS C DI  
KELANTAN**

**oleh**

**NG SI SENG**

**2001010101**

**Tesis yang diserahkan untuk memenuhi  
keperluan bagi Ijazah Sarjana Sains**

**Januari 2001**

## **PENGHARGAAN**

Saya bersyukur kepada Tuhan atas segala kasih, kasih karunia dan kekuatan yang diberi kepada saya terutama semasa menghadapi masaalah yang tanpanya saya tidak dapat melengkapinya penyelidikan ini.

Penghargaan setinggi-tingginya saya ingin tujukan kepada Prof. Madya Dr. Phua Kia Kien, selaku penyelia utama di sepanjang penyelidikan dan penyediaan tesis ini. Semua panduan, bimbingan dan galakan beliau bagi menjayakan penyelidikan ini amat saya sanjungi. Saya juga ingin mengucapkan ribuan terima kasih kepada Dr. Bina Menon, selaku penyelia bersama yang banyak memberi galakan dan nasihat dalam pembentangan hasil dan penghabisan penyelidikan ini terutama semasa penyelia utama berada di Australia. Saya juga ingin mengucapkan terima kasih kepada Dr. Scott Bowden dan Prof. Madya Dr. Phua Kia Kien yang memberi bantuan dalam menjalankan ujian komersial prob garisan (Inno-LiPA™) untuk penjenisan genotip HCV di Australia.

Ucapan teima kasih juga dirakamkan kepada Dr. Janet Cox Singh, Encik Tang T.H. dan Encik Mohamad Ros Sidek yang juga banyak memberi nasihat teknikal semasa penyelidikan. Saya juga ingin mengucapkan terima kasih kepada Dr. Syed Hatim yang memberi nasihat dari segi analisa statistik dalam kajian ini. Ribuan terima kasih saya juga rakamkan semua pegawai penyelidik dan staf di makmal imunologi atas segala bantuan dan kehadiran mereka yang memeriahkan suasana penyelidikan saya.

Saya juga harus mengucapkan berbanyak-banyak terima kasih kepada pihak Jabatan Imunologi, pihak PPSP, USM amnya kerana memberi saya peluang menjalankan kajian ijazah lanjutan ini. Penghargaan juga ditujukan kepada pihak Kementerian Sains, Teknologi dan Alam Sekitar di atas pemberian geran IRPA bagi membantu pelaksanaan penyelidikan ini dan memberi bantuan kewangan melalui Skim Biasiswa Khas kepada saya.

Akhir sekali, saya ingin menghulurkan setinggi-tinggi penghargaan kepada isteri saya, Ting Ting dan ahli keluarga yang tercinta atas doa dan sokongan mereka kepada saya sepanjang penyelidikan ini.

## **JADUAL KANDUNGAN**

	<b>Muka Surat</b>
<b>PENGHARGAAN</b>	ii
<b>JADUAL KANDUNGAN</b>	iii
<b>SENARAI RAJAH</b>	vii
<b>SENARAI JADUAL</b>	ix
<b>SENARAI SINGKATAN</b>	xi
<b>ABSTRAK</b>	xiii
<b>ABSTRACT</b>	xv
<b>BAB 1 PENGENALAN</b>	1
1.1 Virus Hepatitis C (HCV)	1
1.1.1 Organisasi Genom HCV	1
1.1.2 Pengklasifikasi HCV	3
1.1.3 Konsep Heterogeneiti / Kuasispesies HCV	4
1.1.3 (a) Cara-cara Membandingkan Jujukan	5
1.1.3 (b) Identifikasi Jenis dan Subjenis HCV	5
1.1.3 (c) Pengkelasan Varian Jujukan HCV	8
1.2 Penyakit Hepatitis C (Kepentingan Klinikal)	11
1.2.1 Transmisi	11
1.2.1 (a) Etiologi	12
1.2.1 (b) Infeksi Akut	14
1.2.1 (c) Infeksi Kronik	15
1.2.1 (d) Hakikat daripada infeksi HCV	16
1.2.2 Rawatan Infeksi HCV	18
1.3 Penyiasatan Makmal untuk Pengesanan HCV	20
1.3.1 Transkripsi Berbalik-Tindakbalas Rantaian Polimerase (RT-PCR)	20
1.3.2 Analisis Penyerapan 'Southern'	22
1.3.3 Kaedah Serologi / ELISA	23
1.4 Prevalen Virus Hepatitis C	28
1.4.1 Pembahagian Geografi Virus Hepatitis C	28
1.4.1 (a) Pembahagian Geografi Mengikut Prevalen HCV	28
1.4.1 (b) Pembahagian Geografi Mengikut Genotip HCV	31
1.4.2 Prevalen Antibodi Anti-HCV di Malaysia	36
1.5 Justifikasi, Matlamat dan Perancangan Kajian	38

2.1	Persampelan, Ujian Serologi dan Ujian Patologi Kimia	43
2.1.1	Pengumpulan Sampel	43
2.1.2	Penyimpanan Maklumat-Maklumat Subjek	43
2.1.3	Pengesanan Antibodi Anti-HCV	44
2.1.4	Pengukuran Paras Enzim Alanina Aminotransferase (ALT) dan Aspartat Aminotransferase (AST)	46
2.2	Pengekstrakan RNA Virus HCV	48
2.2.1	Kaedah Asid Guanidium Tiosianat-Fenol-Kloroform	48
2.2.2	Kaedah Kolumn	49
2.3	Kaedah Diagnostik Komersial (Ujian 'Amplicor™ HCV')	50
2.3.1	Penyediaan Reagen	50
2.3.2	Penyediaan Kontrol Reagen dan Spesimen	50
2.3.3	Amplifikasi	52
2.3.4	Pengesanan Produk PCR melalui Kaedah ELISA	53
2.3.5	Interpretasi Hasil	56
2.4	Ujian Transkripsi Berbalik - Tindakbalas Rantaian Polimerase (RT-PCR)	56
2.4.1	Kaedah 'In-house I'	56
2.4.2	Kaedah 'In-house II'	59
2.5	Analisis Elektroforesis Gel Agaros	61
2.6	Pengesanan ELISA	61
2.7	Analisis Penyerapan 'Southern'	65
2.7.1	Elektroforesis dan Pemprosesan gel	65
2.7.2	Pemprosesan Blot	67
2.7.3	Denaturasi Prob	67
2.7.4	Penghibridan Prob	67
2.7.5	Pengesanan 'Chemiluminescent'	68
2.7.5 (a)	Proses Penyekatan	70
2.7.5 (b)	Pengeraman Streptavidin	70
2.7.5 (c)	Pembasuhan dengan Larutan Pembasuhan I	70
2.7.5 (d)	Pengeraman Alkaline Fosfatase yang Berbiotin.	70
2.7.5 (e)	Pembasuhan dengan Larutan Penyekatan	71
2.7.5 (f)	Pembasuhan dengan Larutan Pembasuhan II	71
2.7.5 (g)	Pengesanan DNA	71
2.8	Penjenisan Genotip HCV	72
2.8.1	Kaedah Prob Garisan Komersial ('Line Probe Assay')	72
2.8.2	Kaedah 'In-house'	73
2.8.2 (a)	Ujian RT-NPCR 1 ('Nest I')	76
2.8.2 (b)	Ujian RT-NPCR 2 ('Nest II')	77

### **BAB 3 HASIL**

3.1	Ujian Serologi, Patologi Kimia dan Pengekstrakan	
3.1.1	Pengesanan Antibodi Anti-HCV	80
3.1.2	Pengukuran Paras Enzim Alanina Aminotransferase (ALT) dan Aspartat Aminotransferase (AST)	80
3.1.3	Pengekstrakan RNA	81
3.2	Pembangunan Kaedah Transkripsi Berbalik - Tindakbalas Rantaian Polimerase 'In-house I'	83
3.2.1	Pengoptimuman Templat	83
3.2.2	Pengoptimuman Kepekatan Magnesium Klorida (MgCl <sub>2</sub> )	85
3.2.3	Pengoptimuman Kepekatan Primer	85
3.2.4	Pengoptimuman Kepekatan Deoksiribonukleosida Trifosfat (dNTP)	88
3.2.5	Pengoptimuman Kuantiti Enzim <i>Taq</i> DNA Polimerase	88
3.2.6	Pengoptimuman Kuantiti Enzim 'Reverse Transcriptase'	91
3.3	Analisa Penyerapan 'Southern'	91
3.4	Perbandingan Keberkesanan Kaedah Komersial, Kaedah 'In-House I' dan Kaedah 'In-house II' untuk Pengesanan RNA HCV	94
3.5	Prevalen Virus Hepatitis C di Kelantan	110
3.6	Penjenisan Genotip Virus Hepatitis C	118

### **BAB 4: PERBINCANGAN**

4.1	Pengekstrakan RNA	126
4.2	Pembangunan Proses Transkripsi Berbalik -Tindakbalas Rantaian Polimerase (RT-PCR)	
4.2.1	Kaedah RT-PCR 'In-house I'	128
4.2.2	Kaedah RT-PCR 'In-house II'	131
4.3	Analisis Penyerapan 'Southern'	131
4.4	Perbandingan Keberkesanan Kaedah Komersial, Kaedah 'In-House I' dan Kaedah 'In-house II' untuk Pengesanan RNA HCV	133
4.5	Prevalen Virus Hepatitis C di Hospital Universiti Sains Malaysia, Kelantan	138

4.6	Penjenisan Genotip Virus Hepatitis C	142
<b>BAB 5: KESIMPULAN</b>		145
<b>RUJUKAN</b>		151
<b>LAMPIRAN-LAMPIRAN</b>		166

## **SENARAI RAJAH**

<b>RAJAH</b>	<b>TAJUK</b>	<b>MUKASURAT</b>
<b>1.1</b>	Organisasi genom virus Hepatitis C.	2
<b>1.2</b>	Analisis filogenetik bagi jujukan nukleotida pada sebahagian daripada bahagian HCV NS-5.	7
<b>1.3</b>	Analisis filogenetik bahagian 5' yang tak berkodon pada HCV.	9
<b>1.4</b>	Analisis filogenetik jujukan sebahagian daripada bahagian teras HCV yang menunjukkan empat kumpulan varian jujukan utama.	10
<b>1.5</b>	Antigen-antigen HCV yang digunakan di dalam ujian anti-HCV generasi berlainan untuk pengenalpastian anti-HCV.	25
<b>1.6</b>	Ujian RIBA untuk pengesahan ujian anti-HCV yang positif.	27
<b>2.1</b>	Prinsip-prinsip ujian generasi kedua ABBOTT HCV EIA .	45
<b>2.2</b>	Pengesanan produk PCR melalui kaedah EIA	54
<b>2.3</b>	Penerangan bergambarajah tentang prinsip-prinsip PCR ELISA.	63
<b>2.4</b>	Susunan komponen-komponen untuk penyerapan 'Southern'.	66
<b>2.5</b>	Prinsip-prinsip kaedah pengesanan 'chemiluminescent'.	69
<b>2.6</b>	Penjenisan genotip HCV RNA yang berbeza (1a, 1b, 2a, 2b, 3a, 3b, 4, 5a dan 6a) dengan kaedah penjenisan 'in-house'.	75
<b>3.1</b>	Analisis elektroforesis gel agaros ke atas produk RT-PCR kaedah 'in-house I' untuk membandingkan keberkesanan antara kaedah fenol-kloroform dan kaedah column dengan menggunakan isipadu serum yang berlainan.	82
<b>3.2</b>	Analisis elektroforesis gel agaros ke atas produk RT-PCR dengan kaedah 'in-house I' bagi kontrol 'in-house' positif untuk pengoptimuman isipadu templat yang diperlukan untuk tindakbalas 'in-house' RT-PCR.	84

<b>3.3</b>	Analisis elektroforesis gel agaros ke atas produk RT-PCR bagi subjek yang RNA HCV positif dengan kaedah 'in-house I' untuk pengoptimuman kepekatan magnesium klorida.	86
<b>3.4</b>	Analisis elektroforesis gel agaros pada produk RT-PCR bagi subjek yang RNA HCV positif dengan kaedah 'in-house I' untuk pengoptimuman kepekatan setiap primer.	87
<b>3.5</b>	Analisis elektroforesis gel agaros ke atas produk RT-PCR bagi subjek RNA HCV positif untuk pengoptimuman kepekatan deoksiribonukleosida trifosfat campuran.	89
<b>3.6</b>	Analisis elektroforesis gel agaros pada produk RT-PCR dengan kaedah 'in-house I' bagi subjek yang RNA HCV positif untuk pengoptimuman kepekatan enzim polimerase <i>Taq</i> .	90
<b>3.7</b>	Analisis elektroforesis gel agaros ke atas produk RT-PCR bagi subjek RNA HCV positif dengan kaedah 'in-house I' untuk pengoptimuman enzim 'reverse transcriptase'.	92
<b>3.8</b>	Analisis elektroforesis gel agaros ke atas produk RT-PCR dengan kaedah 'In-house I' dan hibridisasi 'Southern' dengan menggunakan prob 'in-house I' ke atas produk RT-PCR 'in-house I' bagi subjek-subjek yang anti-HCV antibodi positif.	93
<b>3.9</b>	Graf yang menunjukkan pembahagian prevalen RNA HCV mengikut seks dan kumpulan pesakit.	114
<b>3.10</b>	Graf yang menunjukkan pembahagian prevalen RNA HCV pada kumpulan penderma darah, pesakit yang menerima pelbagai kali transfusi darah dan pesakit hepatitis mengikut golongan umur.	117
<b>3.11</b>	Analisis hasil penjenisan genotip HCV dengan kaedah komersial prob garisan (Inno-LiPA™).	120
<b>3.12</b>	Analisis elektroforesis gel agaros pada produk RT-NPCR bagi subjek-subjek yang mengandungi HCV genotip yang berlainan.	121



## SENARAI JADUAL

<b>JADUAL</b>	<b>TAJUK</b>	<b>MUKASURAT</b>
<b>1.1</b>	Prevalen anti-HCV pada penderma darah (1989-1992)	29
<b>1.2</b>	Tatanama bagi jujukan HCV yang diterbitkan dan perbandingan antara sistem-sistem klasifikasi virus HCV.	32
<b>1.3</b>	Pembahagian geografi genotip-genotip HCV : Bilangan strain yang dijeniskan dalam setiap kajian berikut.	34
<b>1.4</b>	Pembahagian geografi subjenis HCV: Bilangan strain yang dijeniskan pada setiap kajian berikut.	35
<b>1.5</b>	Prevalen anti-HCV pada penderma darah di Malaysia.	37
<b>1.6</b>	Pembahagian anti-HCV mengikut umur.	37
<b>2.1</b>	Set primer yang digunakan dalam kaedah 'in-house I' untuk pengesanan RNA HCV.	57
<b>2.2</b>	Set primer yang digunakan dalam kaedah 'in-house II' untuk pengesanan RNA HCV.	59
<b>2.3</b>	Prob-prob yang digunakan dalam kaedah 'in-house I' dan 'in-house II' untuk pengesanan ELISA.	62
<b>2.4</b>	Primer-primer yang digunakan di dalam ujian penjenisan genotip HCV kaedah 'in-house' yang didapati daripada jenis databes DDBJ, di Institut Genetik Negara, Jepun.	74
<b>3.1</b>	Carta perbandingan hasil pengesanan HCV dengan kaedah komersial, 'in-house I' dan 'in-house II'.	96
<b>3.2</b>	Ringkasan hasil perbandingan ujian penyaringan dengan kaedah 'in-house I' dan 'in-house II' dengan kaedah komersial.	100
<b>3.3</b>	Carta perbandingan hasil ulangan pengesanan RNA HCV dengan kaedah komersial dan 'in-house I' bagi hasil positif palsu.	100
<b>3.4</b>	Carta perbandingan hasil ulangan pengesanan RNA HCV dengan kaedah komersial dan 'in-house II' bagi hasil positif palsu.	101

<b>3.5</b>	Carta perbandingan hasil ulangan pengesanan RNA HCV dengan kaedah komersial dan 'in-house I' bagi hasil negatif palsu.	103
<b>3.6</b>	Carta perbandingan hasil ulangan pengesanan HCV dengan kaedah komersial dan 'in-house II' bagi hasil negatif palsu.	104
<b>3.7</b>	Jadual perbandingan hasil pengesanan kaedah komersial berbanding kaedah 'in-house I'.	105
<b>3.8</b>	Jadual perbandingan hasil pengesanan kaedah komersial berbanding kaedah 'in-house II'.	105
<b>3.9</b>	Pembahagian hasil pengesanan RNA HCV mengikut antibodi anti-HCV dan paras ALT/AST.	107
<b>3.10</b>	Prevalen RNA HCV dalam pelbagai kumpulan subjek di HUSM.	111
<b>3.11</b>	Pembahagian prevalen RNA HCV dalam penderma-penderma darah yang anti-HCV positif, pesakit yang berulang kali menerima transfusi darah dan pesakit hepatitis mengikut jantina.	113
<b>3.12</b>	Prevalen RNA HCV dalam penderma-penderma darah yang anti-HCV positif, pesakit yang berulang kali menerima transfusi darah dan pesakit hepatitis mengikut golongan umur.	116
<b>3.13</b>	Perbandingan hasil penjenisan genotip HCV dengan kaedah prob garisan komersial dan transkripsi berbalik-tindakbalas rantaian polimerase bersarang (RT-NPCR).	122
<b>3.14</b>	Jadual perbandingan hasil pengesanan kaedah prob garisan komersial (Inno-LiPA™) berbanding kaedah 'in-house' RT-NPCR bagi genotip 1a.	124
<b>3.15</b>	Jadual perbandingan hasil pengesanan kaedah prob garisan komersial (Inno-LiPA™) berbanding kaedah 'in-house' RT-NPCR bagi genotip 3a .	124
<b>3.16</b>	Jadual perbandingan hasil pengesanan kaedah prob garisan komersial (Inno-LiPA™) berbanding kaedah 'in-house' RT-NPCR bagi genotip campuran	125

## SENARAI SINGKATAN

A <sub>450</sub>	Bacaan kepadatan optikal pada 450nm
ABTS®	2,2'-Azino-di-[3-etilbenzotiazolina sulfonat] diamonium
ALT	Alanina aminotransferase
AMV	'Avian Myeloblastosis Virus'
anti-DIG-POD	Anti-digoksigenin peroksidase
AST	Aspartat aminotransferase
BD	Penderma darah ('blood donors')
BVDV	Virus diarrhoea bovine ('bovine diarrhoea virus')
CAH	Hepatitis kronik yang aktif ('chronic active hepatitis')
cDNA	'complimentary DNA'
CRF	Kegagalan renal kronik ('chronic renal failure')
DEPC	Dietilpirokarbonat
DIG	Digoksigenin
DIG-dUTP	Digoksigenin-deoksiuridin-5'-trifosfat
DNA	Asid deoksiribonukleik
dNTP	Deoksiribonukleosida trifosfat
DTT	1,4-Dithiothreitol threo-1,4-dimercapto-2,3-butanediol
EDTA	Asid etilenediamine tetra asetik
EIA	Ujian enzim immunoasai ('enzyme immunoassay')
ELISA	'Enzyme-linked immunoabsorbant assay'
FHF	Kegagalan hepatic fulminan ('fulminant hepatic failure')
GOT	Glutamik-oksaloasetik transaminase
GPT	Glutamik-piruvat transaminase
HCC	Karsinoma hepatoselular ('hepatocellular carcinoma')
HCV	Virus hepatitis C ('hepatitis C virus')
HIV	Virus immunodefisiensi manusia ('human immunodeficiency virus')
HoCV	Virus kolera hog ('hog cholera virus')
HP	Pesakit hepatitis ('hepatitis patients')
HRP	'Horse radish peroksidase'
HUSM	Hospital Universiti Sains Malaysia
Inno-LiPA™	Kaedah komersial prob garisan ('Innogenetics line probe assay')
KCl	Kalium klorida
LDH	Laktat dehidrogenase
LH	Kaedah penghibridan cecair ('liquid hybridization method')
MDH	Malat dehidrogenase
MgCl <sub>2</sub>	Magnesium klorida
MMLV	'Reverse transcriptase moloney murine leukemia virus'
MTP	Pesakit yang berulang kali menerima transfusi darah ('multiply transfused patients')
MWP	Plat mikroterusan ('microwell plate')
NaCl	Natrium klorida ('sodium chloride')
NAD <sup>+</sup>	Nikotinamida-adenina-dinukleotida
NADH	Nikotinamida-adenina-dinukleotida-hidrogen
NANB	Bukan-A, bukan-B ('Non-A, Non-B')
nm	Nano meter
O.D.	Bacaan kepadatan optikal ('optical density')

OPD	‘Ortho-Phenilenediamine’
ORF	Rangka bacaan terbuka (‘open reading frame’)
PCR	Tindakbalas rantai polimerase (polymerase chain reaction’)
RFLP	Polimerase pemanjangan fragmen penyekatan (‘restricted fragment length polymorphism’)
RIBA	‘Recombinant immunoblot assay’
RNA	Asid ribonukleik
rpm	Putaran dalam seminit (‘rotations per minute’)
RT	Transkripsi berbalik (‘reverse transcriptase’)
RT-NPCR	Transkripsi berbalik-tindakbalas rantai polimerase bersarang (‘reverse transcriptase-nested polymerase chain reaction’)
RT-PCR	Transkripsi berbalik-tindakbalas rantai polimerase (‘reverse transcriptase-polymerase chain reaction’)
SDS	Sodium dodesil sulfat
SSC	Natrium sitrat, natrium klorida
TBE	Tris, asid borik, EDTA
TE	Tris, EDTA
TMB	3,3',5,5'-tetrametilbenzidina
tRNA	RNA pemindahan (‘transfer RNA’)
Tris-HCl	Tris-asid hidroklorik
UNG	Urasil-N-glikosilase
VIDRL	‘Victorian Infectious Diseases Reference Laboratory’

## ABSTRAK

Virus hepatitis C (HCV) mengandungi RNA yang bersalinan tunggal. Genomnya bersaiz lebih kurang 10,000 nukleotida dan ia mengekodkan 3,000 asid amino. Ia menyebabkan 90-95% kes-kes post-transfusi bukan-A, bukan-B (NANB) hepatitis. Walaupun pengenalan ujian serologi telah mengurangkan infeksi HCV, ujian-ujian tersebut mempunyai kelemahannya tersendiri seperti ia tidak dapat mengesan infeksi HCV semasa jangkamasa tingkap infeksi dan ia tidak dapat membezakan infeksi semasa, lepas dan yang telah sembuh.

Objektif kajian ini adalah untuk membangunkan satu kaedah transkripsi berbalik-tindakbalas rantaian polimerase (RT-PCR) 'in-house I'. Kemudian keberkesanannya dinilai bersama dengan satu kaedah 'in-house II' yang telah dibangunkan berbanding dengan satu ujian RT-PCR komersial ('Roche Amplicor™ HCV') untuk pengesanan RNA HCV. Kajian ini juga menentukan prevalen RNA HCV di Kelantan. Selain itu, keberkesanan satu kaedah transkripsi berbalik-tindakbalas rantaian polimerase bersarang dinilai berbanding dengan ujian prob garisan komersial (Inno-LiPA™) untuk penjenisan RNA HCV.

500 sampel telah dikutip daripada penderma-penderma darah yang anti-HCV positif, pesakit-pesakit yang berulang kali menerima transfusi darah dan pesakit-pesakit hepatitis. Satu kaedah 'in-house I' yang dilaporkan telah diubahsuai, dioptimakan dan digunakan untuk menguji 100 sampel untuk RNA HCV. Bersama dengan satu kaedah 'in-house II' yang telah dibangunkan, keberkesannya dievaluasikan berbanding dengan kaedah 'Amplicor™ HCV' untuk pengesanan RNA HCV. Kaedah 'Amplicor™ HCV' juga telah

digunakan untuk menguji 500 sampel dan prevalen RNA HCV pada kumpulan subjek yang berbeza ditentukan. 50 sampel yang positif untuk HCV telah dipilih untuk mengkaji keberkesanan satu kaedah penjenisan HCV 'in-house' yang telah dibangunkan. Ia dibandingkan dengan kaedah komersial Inno-LiPA™.

Parameter-parameter untuk kaedah RT-PCR 'in-house I' yang optima adalah 10µL untuk templat RNA yang tulen, 1.0mM, 0.1µM dan 200µM untuk kepekatan magnesium klorida, setiap primer, dan deoksiribonukleosida trifosfat, 1.0 unit dan 5 unit untuk kuantiti enzim *Taq* DNA polimerase dan 'avian myeloblastosis virus reverse transcriptase'. Kaedah RT-PCR 'in-house I' mempunyai kespesifikan yang setara dengan ujian 'Amplicor™ HCV' manakala kaedah RT-PCR 'in-house II' mempunyai kesensitifan yang setara dengan ujian 'Amplicor™ HCV' untuk pengesanan RNA HCV. Prevalen RNA HCV pada penderma-penderma darah, pesakit yang berulang kali menerima transfusi darah dan pesakit hepatitis adalah 0.53, 39.6, dan 33.3% dengan batasan-batasan tertentu. Kaedah penjenisan genotip yang telah dibangunkan memberi hasil kualitatif yang mempunyai kesensitifan dan kespesifikan yang setara dengan kaedah komersial prob garisan untuk HCV genotip 1a.

Kaedah 'in-house I' mempunyai kespesifikan manakala kaedah 'in-house II' mempunyai kesensitifan yang setara dengan kaedah 'Amplicor™ HCV' untuk pengesanan RNA HCV. Prevalen RNA HCV antara penderma-penderma darah, pesakit-pesakit yang berulang kali menerima transfusi darah dan pesakit hepatitis di Kelantan adalah 0.53, 39.6, dan 33.3% dengan batasan-batasan tertentu.

## **ABSTRACT**

### **DETECTION OF HEPATITIS C VIRUS BY USING REVERSE TRANSCRIPTION-POLYMERASE CHAIN REACTION ELISA: PREVALENCE OF HEPATITIS C IN KELANTAN**

Hepatitis C virus (HCV) is a positive sense single-stranded RNA virus with a genome of approximately 10,000 nucleotides coding for 3,000 amino acids. It is responsible for 90-95% of post-transfusion non-A, non-B (NANB) hepatitis cases. Although the implementation of serological assays has reduced the incidence of HCV infection, these assays have their limitations, such as their inability to detect infection during the window period of infection and to differentiate between current, past and resolved infections.

The objective of this study was to develop an optimized in-house I RT-PCR method. Then, its efficiency was evaluated together with another developed in-house II method in comparison with a commercial RT-PCR assay (Roche Amplicor™ HCV) for the detection of HCV RNA. Subsequently, the prevalence of HCV RNA in Kelantan was determined. This study also has the aim to evaluate the efficiency of an in-house developed primer-specific reverse transcription-nested polymerase chain reaction (RT-NPCR) method in comparison with a commercial line probe assay (Inno-LiPA™) for the genotyping of HCV RNA.

Five hundred samples were collected from multiply transfused patients, hepatitis patients and anti-HCV antibody positive blood donors. A published in-house method was modified, optimized, and used to screen 100 samples and its efficiency was evaluated

together with a developed in-house II method in comparison with the Amplicor™ HCV method for the detection of HCV RNA. The Amplicor™ HCV method was also used to screen 500 collected samples and the prevalence of HCV RNA among different subject groups was determined. 50 HCV-RNA positive samples were selected and used to test the efficiency of an in-house developed genotyping method by comparing with a commercial assay (Inno-LiPA™) for genotyping HCV RNA.

The optimized parameters for in-house I method were 10µL of purified RNA template, 1.0mM of magnesium chloride, 0.1µM of each primer, 200µM of each deoxyribonucleoside triphosphate concentrations, 1.0 unit of *Taq* DNA polymerase and 5 units of avian myeloblastosis virus reverse transcriptase, respectively, in 50µL of reaction mixture. In-house I method has the specificity that was comparable with the Amplicor™ HCV assay whereas in-house II method has the sensitivity that was comparable with the Amplicor™ HCV assay for the detection of HCV RNA. The prevalence of HCV RNA among the blood donors, multiply transfused and hepatitis patients in Kelantan were 0.53, 39.6, and 33.3%, respectively with certain limitations. The in-house developed genotyping method gave sensitivity and specificity qualitative results comparable with the line probe assay for HCV genotype 1a.

In-house I method has the specificity whereas in-house II method has sensitivity that was comparable with the Amplicor™ HCV method for the detection of HCV RNA. The prevalence of HCV RNA among blood donors, multiply-transfused and hepatitis patients in Kelantan were 0.53, 39.6, and 33.3%, respectively with certain limitations.



## **BAB 1**

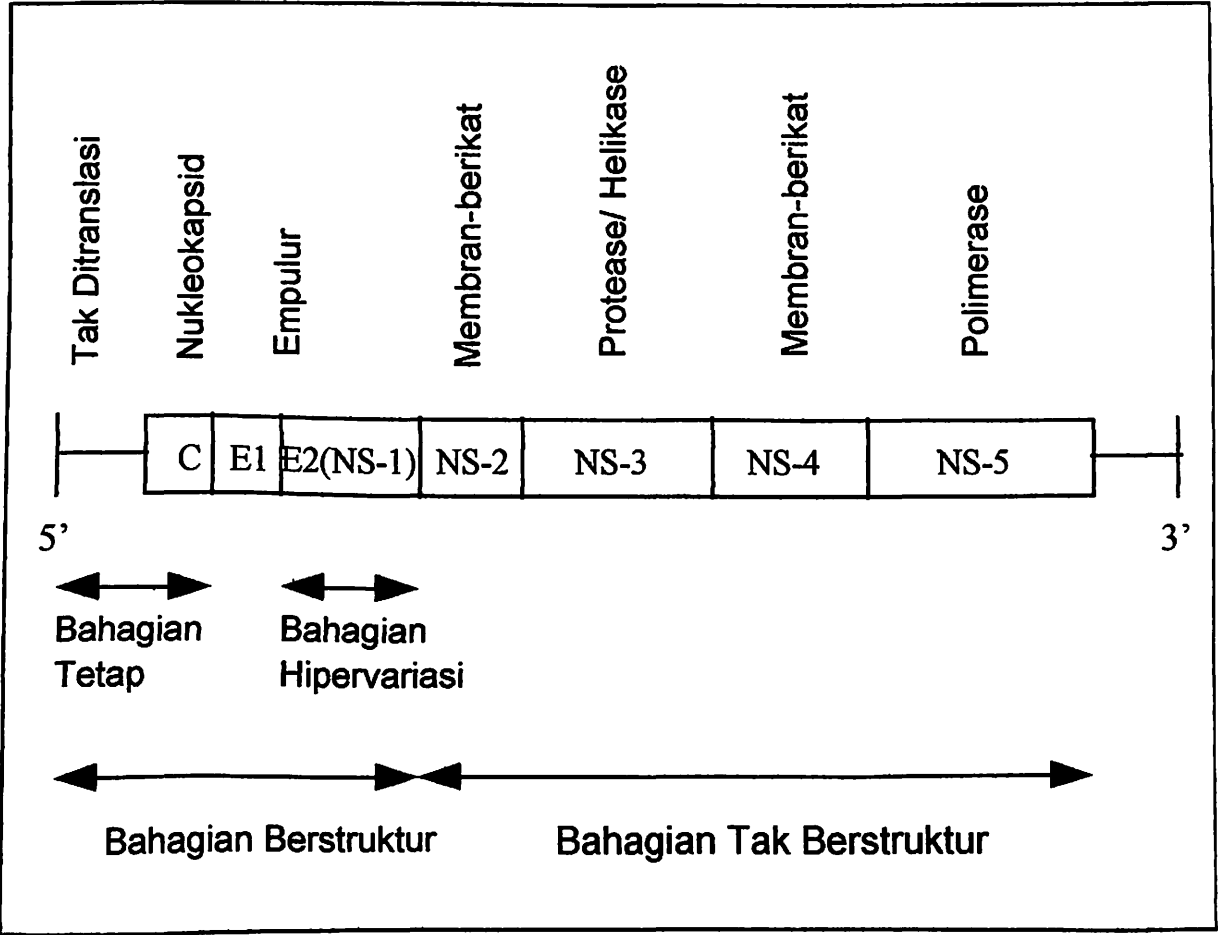
### **PENGENALAN**

#### **1.1 VIRUS HEPATITIS C (HCV)**

##### **1.1.1 Organisasi Genom HCV**

Virus Hepatitis C (HCV) mengandung genom RNA yang berlipatan positif dan saiznya lebih kurang 10,000 nukleotida (Choo *et al.*, 1990). Ia mengekodkan satu poliprotein virus yang bersaiz 3,011 asid amino yang kemudian diproseskan menjadi protein virus individu yang lain. Perbandingan analisis jujukan menunjukkan bahawa walaupun HCV adalah kelas virus baru, ia mempunyai organisasi genetik yang serupa dengan flavivirus dan pestivirus yang merupakan dua genera bagi famili *Flaviviridae* yang berbeza.

Seperti flavivirus dan pestivirus, HCV menghasilkan protein struktur pada sukuan hujung-NH<sub>2</sub> bagi poliprotein virus dan satu protein nukleokapsid asas dan satu glikoprotein empulur virus (Rajah 1.1). Poliprotein virus lain menghasilkan pelbagai protein bukan struktur (NS) yang bertanggungjawab dalam replikasi dan penyusunan virus. Protein NS tersebut termasuk enzim helikase virus (NS3) dan replikase (NS5). Protein terakhir (NS5) yang ditranslasikan adalah protein yang terbesar dan dikenalpasti sebagai RNA polimerase yang bergantung kepada RNA (Rajah 1.1).



**Rajah 1.1:** Organisasi genom virus hepatitis C (Hess, 1994).

Jujukan nukleotida genomiknya mengandungi satu rangka bacaan terbuka (ORF) yang besar dan memanjang. Hujung 5' genomnya adalah sangat kekal (90%) di antara isolat-isolat HCV yang berbeza di seluruh dunia (Collett *et al.*, 1988). Bahagian yang tak-berkodan ini dan bahagian empulur virus adalah sangat kekal manakala bahagian virus lain adalah sangat berbeza-beza. Oleh itu, ia memainkan peranan penting di dalam sesetengah aspek translasi, replikasi dan penyusunan virus. Epitop antigenik yang berbeza-beza di dalam bahagian empulur dan bahagian tak-berkodan adalah sasaran primer untuk tindakbalas imuno humoral dan digunakan untuk ujian pengesanan antibodi HCV (Trepo *et al.*, 1993).

### 1.1.2 Pengklasifikasi HCV

HCV telah dicadangkan untuk dikelaskan ke dalam genus berbeza di dalam famili *Flaviviridae* (Choo *et al.*, 1991; Han *et al.*, 1991) iaitu kumpulan yang mengandungi pestivirus (Collet *et al.*, 1988). Selain daripada kesamaan jujukan pada protein NS3 dan NS5, terdapat hubungan erat di antara HCV dan pestivirus terutama pada bahagian hujung 5' yang tak berkodan (5'NCR) yang mempunyai homologi jujukan nukleotida (Ilan *et al.*, 1991) dan kesamaan struktur sekunder RNA semasa pasangan bes dalaman (Brown *et al.*, 1992). Di sebaliknya, flavivirus mempunyai 5'NCR yang pendek dan mekanisme 'scanning' ribosom yang bergantung kepada 'cap' bagi permulaan translasi (Chambers *et al.*, 1990). Terdapat lagi kesamaan antara pestivirus dan HCV iaitu kepelbagaian jujukan pada bahagian genom yang mengekodkan protein empulur yang sangat berglikosilat. Bahagian tetap dan berhipervariasi didapati pada bahagian protein E2/NS1 HCV dan protein gp53 pestivirus, virus diarrhoea bovine (BVDV) dan virus kolera hog (HoCV).

Tambahan pula, dengan penggunaan kaedah tindakbalas rantaian polimerase (PCR) dan bukan PCR, jujukan nukleotida HCV dan jujukan asid aminonya telah dibandingkan. Daripada hasil perbandingan itu, terdapat sekurang-kurangnya tiga kumpulan utama genotip HCV (Kumpulan I-III; Houghton *et al.*, 1991). HCV juga didapati berevolusi pada kadar yang serupa dengan virus RNA yang lain (Holland *et al.*, 1982; Chambers *et al.*, 1990) dan famili yang berkaitan dengan HCV boleh dibahagikan mengikut kuasi-spesisnya (Martell *et al.*, 1992).

Di dalam genom HCV, terdapat 'subregion' yang mempunyai jujukan nukleotida dan asid amino yang heterogeneitinya bertambah termasuk domain hipervariable (E2 HV) yang terdapat di terminal-N bagi protein E2/NS yang terdapat di dalam semua isolat virus (Hijikata *et al.*, 1991; Ogata *et al.*, 1991; Weiner *et al.*, 1991). Domain hipervariasi yang serupa tidak pernah dilaporkan pada pesti- dan flavivirus. Sub-bahagian yang bervariasi secara kumpulan spesifik juga nyata (Weiner *et al.*, 1991; Hijikata *et al.*, 1991; Ogata *et al.*, 1991). Variasi jujukan asid amino yang kelihatan pada domain E2 HCV mungkin disebabkan oleh pemilihan imun dan mungkin penting bagi imuniti perlindungan (Weiner *et al.*, 1996).

### **1.1.3 Konsep Heterogeneiti / Kuasispesies HCV**

HCV adalah sejenis virus yang tidak menunjukkan jujukan kewarisan berterusan tetapi ia menonjolkan kehadiran bilangan jenis virus yang terhad dan biasanya mempunyai kesamaan jujukan keseluruhan sebanyak 67 - 70%.

### **1.1.3 (a) Cara-cara Membandingkan Jujukan**

Terdapat beberapa cara untuk membandingkan jujukan antara HCV. Kedua-dua jujukan nukleotida dan asid amino boleh dibanding untuk mencari perhubungan antara virus. Lazimnya, perbandingan tersebut melibatkan penganggaran jarak pasangan nukleotida antara jujukan dan 'inference' hubungan filogenetik.

'Inference' hubungan filogenetik dapat dicari dengan mengumpulkan matriks jarak pasangan nukleotida dengan pengiraan algoritma seperti penyambungan 'NEIGHBOR' (Saitou and Nei, 1987). Satu lagi cara yang lain adalah penggunaan jujukan nukleotida secara langsung. Ia melibatkan kesamaan maksima 'inference' pada suatu model evolusi molekular (Felsenstein, 1988).

Antara cara yang paling popular adalah persampelan semula 'bootstrap' di mana bilangan pokok yang banyak dilukis secara rawak daripada data asal (Felsenstein, 1988). Dengan penggunaan cara-cara perbandingan jujukan tersebut, jenis-jenis dan subjenis-subjenis HCV dapat diidentifikasi.

### **1.1.3 (b) Identifikasi Jenis dan Subjenis HCV**

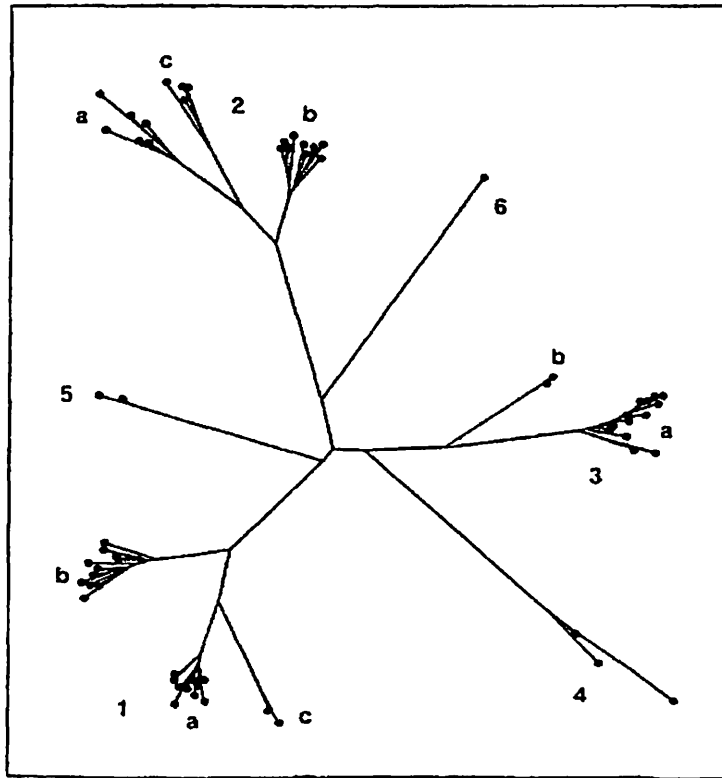
Perbandingan jujukan nukleotida dan asid amino bagi variasi HCV yang berlainan mencadangkan kehadiran kumpulan jujukan yang ketara. Keseluruhan jujukan genom varian HCV dari Jepun [HCV-J (Kato *et al.*, 1990) dan HCV-BK (Takamizawa *et al.*, 1991)] didapati berbeza daripada strain prototip, HCV-1 (Choo *et al.*, 1991); HCV-J dan

HCV-BK menunjukkan 92% kesamaan jujukan nukleotida manakala HCV-J dan HCV-I menunjukkan 79% kesamaan.

Dengan penggunaan cara filogenetik untuk menganalisis bahagian NS-5 (Enomoto *et al.*, 1990), suatu pokok evolusi telah dibina dan analisis lanjutan dilakukan atas penderma-penderma darah negara Scotland (Chan *et al.*, 1992) dan pesakit-pesakit hepatitis bukan-A, bukan-B (NANB) dari negara Thai (Mori *et al.*, 1992), Lebanon, Mesir, Afrika Selatan dan Hong Kong (Simmonds *et al.*, 1993). Hasil daripada kajian ini menunjukkan pembezaan jujukan virus itu kepada enam jenis jujukan utama di mana kebanyakan daripadanya boleh dibahagikan kepada beberapa komponen subjenis. Di bahagian NS-5 perbezaan antara jenis-jenis HCV utama sebanyak 48 - 62% manakala perbezaan subjenis adalah 23 - 25% (Chan *et al.*, 1992). Perhubungan antara jenis dan subjenis varian HCV ditunjukkan di Rajah 1.2.

Walaupun bahagian genom virus yang berbeza menunjukkan kepelbagaian yang berbeza-beza, perbezaan antara jenis dan subjenis HCV masih dikekalkan. Sebagai contoh, perbezaan jujukan antara jenis pada bahagian teras adalah berjulat 15 - 22% dan bahagian NS-3 adalah berjulat 34 - 49% manakala perbezaan jujukan antara subjenis adalah berjulat 9 - 13% pada bahagian teras dan 23-28% pada bahagian NS-3 (Chan *et al.*, 1992; Simmonds *et al.*, 1993).

Kepelbagaian jujukan antara virus-virus lain yang berkaitan dengan HCV dapat menunjukkan kepentingan variasi jujukan HCV. Oleh itu, kajian biologi heterogeneiti antara jenis HCV adalah merupakan suatu jenis kajian yang sangat aktif kini kerana jenis



**Rajah 1.2:** Analisis filogenetik bagi jujukan nukleotida pada sebahagian daripada bahagian HCV NS-5. Enam kumpulan utama jujukan varian ditunjukkan (1-6); setiap bahagian yang berlabel 1, 2, dan 3 mengandungi beberapa jujukan yang lebih berkaitan rapat (a-c) (Simmonds, 1994).

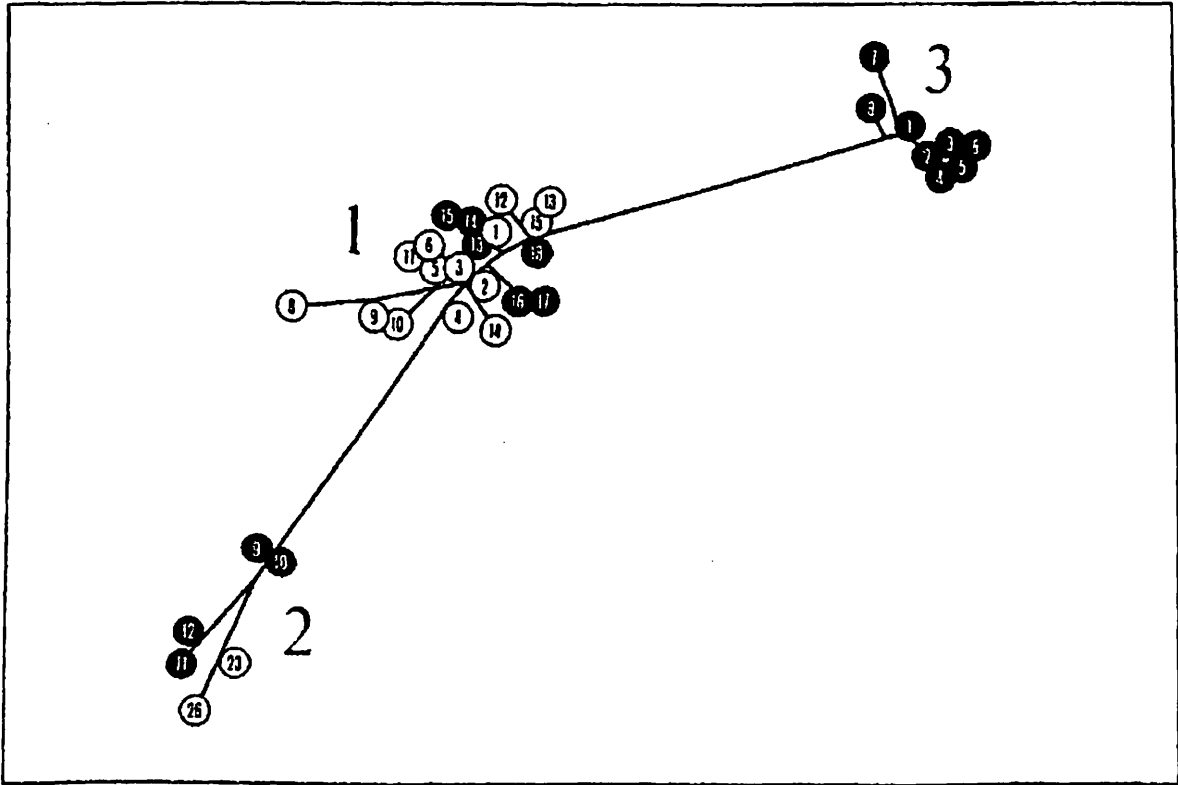
HCV mungkin mempengaruhi punca jangkitan dan tindakbalasnya terhadap rawatan antivirus.

### **1.1.3 (c) Pengelasan Varian Jujukan HCV**

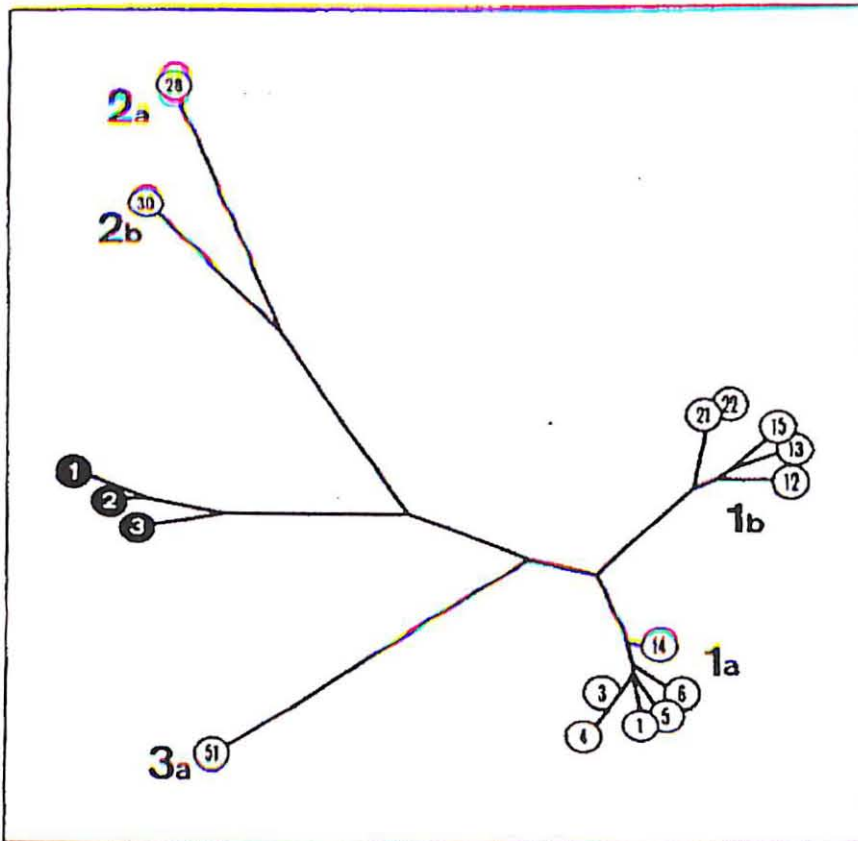
Sejak dulu, pengumpulan filogenetik yang jelas telah mula dilakukan dengan penamaan jujukan prototip HCV-1 sebagai jenis 1a. Subjenisnya dinamakan 1b termasuk genom lengkap jujukan HCV-J dan HCV-BK (Kato *et al.*, 1990; Takamizawa *et al.*, 1991). Genom lengkap jujukan varian HC-J6 dan HC-J8 yang sangat menyimpang dinamakan jenis 2a (Okamoto *et al.*, 1991) dan jenis 2b (Okamoto *et al.*, 1992). Jujukan HCV yang dijumpai di sebahagian penderma-penderma darah Scotland (Chan *et al.*, 1992) dan pesakit-pesakit hepatitis NANB di Thailand (Mori *et al.*, 1992) boleh dinamakan jenis 3, kerana ia berbeza secara jelas dari HCV jenis 1 dan 2 (Rajah 1.2 dan 1.3).

Penderma-penderma darah dan pesakit-pesakit hepatitis NANB di Timur Tengah sentiasa dijangkiti oleh varian HCV yang berbeza daripada jenis 1, 2 dan 3 di bahagian NS-5. Cadangan pengelasan varian HCV ini sebagai jenis HCV yang baru disokong oleh analisis di bahagian teras genom HCV di mana jujukan yang dinamakan jenis 4 didapati berbeza secara ketara daripada HCV jenis 1, 2 dan 3 (Rajah 1.4) (Simmonds *et al.*, 1993). Perbandingan antara jujukan pada individu terjangkit di Afrika Selatan dan Hong Kong membuktikan kehadiran dua HCV yang baru iaitu jenis 5 dan 6 (Rajah 1.2). Individu-individu lain di Timur Tengah adalah dijangkiti oleh varian subjenis HCV jenis 1 yang baru iaitu jenis 1c di Rajah 1.2. Kemudian penderma-penderma darah Scotland dijangkiti dengan subjenis bagi HCV jenis 2 yang baru iaitu jenis 2c (Chan *et al.*, 1992).





**Rajah 1.3:** Analisis filogenetik bahagian 5' yang tak berkodon pada HCV. Tiga kumpulan jujukan itu merupakan tiga pengumpulan yang utama (jenis 1, 2, 3) yang diperhatikan semasa analisis bahagian NS-5 (Simmonds, 1994). Bulatan yang penuh merupakan penderma-penderma darah di Scotland manakala bulatan yang terbuka adalah penderma-penderma darah di Jepun.



**Rajah 1.4:** Analisis filogenetik jujukan sebahagian daripada bahagian teras HCV yang menunjukkan empat kumpulan varian jujukan utama (Simmonds, 1994). Bulatan yang penuh merupakan penderma-penderma darah di Timur Tengah dan bulatan yang terbuka adalah pesakit-pesakit hepatitis NANB di Thailand.

Kini, banyak kajian telah menumpu ke atas kemungkinan perbezaan biologi yang wujud antara genotip HCV. Terdapat beberapa bukti bahawa infeksi dengan genotip virus yang berbeza adalah berkaitan dengan perbezaan punca penyakit dan kemungkinan besar menghidap hepatoselular karsinoma. Adalah lebih nyata bahawa individu yang diinfeksi dengan virus genotip 1 akan kurang memberi reaksi terhadap rawatan interferon jika dibandingkan dengan genotip lain seperti genotip 2 dan 3 (Dusheiko *et al.*, 1994). Perbezaan ini memberi implikasi klinikal untuk pemilihan rawatan pesakit dan dalam pemahaman patogenesis infeksi HCV.

## **1.2 PENYAKIT HEPATITIS C (KEPENTINGAN KLINIKAL)**

### **1.2.1 Transmisi**

Kajian epidemiologi menunjukkan bahawa hampir 42% penyakit adalah melalui penggunaan dadah secara perkongsian jarum, hampir 6% daripada kes-kes HCV adalah direbak daripada ibu ke anak, dan lebih kurang 6, 3, 2, dan 0.6% adalah melalui pendedahan seksual, pendedahan pekerjaan, pendedahan rumahtangga dan hemodialisis (Alter *et al.*, 1990). Oleh itu, hampir 50% kes-kes HCV daripada individu-individu yang bukan berpunca daripada transmisi ibu-bapa boleh menghidap penyakit hepatitis NANB (Alter, 1991). Walaupun HCV mungkin boleh direbak melalui cecair badan seperti air-liur (Dusheiko *et al.*, 1990; Takamatsu *et al.*, 1990; Abe dan Inchauspe, 1991), tiada bukti tentang kehadiran RNA HCV dalam semen manusia.

Transmisi HCV melalui semua produk darah termasuk faktor VIII (Shopnick *et al.*, 1995), imunoglobulin anti-D (Meisel *et al.*, 1995) dan infusi imunoglobulin (Taliani *et al.*,

1995) telah dilaporkan. Walaupun transmisi pasif antibodi daripada produk darah telah dilaporkan (Kuderia *et al.*, 1992), risiko infeksi aktif adalah tertinggi pada pesakit yang menerima pelbagai transfusi atau produk darah yang tertakung untuk kehendak penyakitnya (Eyster *et al.*, 1994).

Transmisi HCV melalui transfusi darah dan pemindahan organ telah banyak dikurangkan selepas pengenalan penggunaan ujian enzim imunoasai (EIA) yang mengesan kehadiran antibodi untuk ujian penyaringan darah.

### 1.2.1 (a) Etiologi

Adalah dipercayai bahawa HCV adalah ditransmisikan melalui pendedahan parenteral dan menyebabkan 95% daripada hepatitis post-transfusi (Plagemann, 1991; Sherlock dan Dusheiko, 1991). Transmisi memanjang yang diinfeksi oleh ibu adalah sangat jarang tetapi ia boleh berlaku terutama pada tahun kedua bagi ibu yang menghadapi infeksi HIV (Novati *et al.*, 1992; Barlow dan Mok, 1993). Di dalam satu pertiga daripada pesakit-pesakit, punca infeksi masih tidak diketahui. Masa eraman selepas transfusi darah adalah lazimnya 7 hingga 8 minggu dengan julat dari 2 hingga 26 minggu. Juga terdapat laporan yang menunjukkan masa eraman yang lebih pendek selepas transfusi faktor koagulasi terinfeksi.

Perkongsi peralatan suntikan oleh penagih dadah jenis suntikan adalah cara transmisi yang paling lazim. Terdapat bukti bahawa beberapa pesakit yang mengongsi penggunaan jarum itu menghidap HCV. Ini menunjukkan kadar pembawaan HCV yang tinggi di kalangan penagih dadah jenis suntikan akibat transmisi virus yang cekap.

Penandaan pada badan dan penebusan telinga mungkin menjadi cara transmisi HCV jika peralatan yang digunakan adalah tidak steril.

Kadar transmisi daripada ibu ke anak (6%) lazimnya berlaku apabila ibu dijangkiti oleh HIV (Locarnini, 1994) atau apabila ibunya mempunyai paras HCV yang tinggi di dalam darahnya (Ohto *et al.*, 1994). Bayi kepunyaan ibu HCV positif lazimnya mempunyai anti-HCV antibodi selepas dilahirkan kerana transmisi antibodi maternal melalui plasenta. Antibodi tersebut akan hilang antara enam hingga lima belas bulan selepas kelahiran. Walaubagaimanapun, risiko transmisi melalui penyusuan ibu adalah minima (Alter, 1994). Data-data terkini menunjukkan bahawa titer virus dalam serum adalah penentu mustahak bagi risiko transmisinya. Misalnya, titer virus yang tinggi perhubung rapat dengan penambahan risiko transmisinya. Oleh sebab paras virus adalah tertinggi semasa fasa akut suntikan, iaitu semasa paras alanina aminotransferase (ALT) adalah tinggi, pemindahan darah pada masa ini membawa risiko transmisi HCV yang paling tinggi.

Pekerja-pekerja kesihatan dan staf makmal yang mengendalikan darah atau produk darah juga mempunyai risiko yang tinggi untuk menghidap HCV jika dibandingkan dengan komuniti am. Kebarangkalian untuk menghidap HCV selepas tercucuk jarum daripada punca yang seropositif adalah 3% (Gerberding dan Henderson, 1992). Transmisi HCV melalui komuniti atau isi rumah dan hemodialisis adalah sangat rendah iaitu 2 dan 0.6%. HCV tidak boleh merebak melalui perhubungan sosial biasa seperti berjabat tangan, berpeluk, bercium dan perkongsian kemudahan tandas.

### 1.2.1 (b) Infeksi Akut

Daripada kajian pada dewasa, penyakit akutnya adalah ringan dan biasanya subklinikal. Keletihan adalah simptom yang lazim dilaporkan dengan penimbunan demam kuning pada 25% daripada kes-kes itu (Alter *et al.*, 1975). Paras ALT bagi pesakit yang mengidap hepatitis C akut adalah lebih rendah daripada pesakit hepatitis B akut, tetapi pembezaan HCV daripada HBV dengan kaedah ini adalah tidak tepat. Kenaikan paras ALT berlaku pada 2 corak yang berbeza: monofasik, dengan penurunan yang cepat atau multifasik, dengan perubahan yang luas. Perubahan yang episodik pada ALT ini mungkin menunjukkan alunan keadaan radang pada sel-sel hati dan kematian sel. Corak multifasik mungkin berhubungan dengan penyakit yang lebih serius atau perkembangan kepada penyakit hati kronik (Alter, 1991).

Pesakit yang menghidapi HCV biasanya asimtomatik atau mengidapi simptom-simptom yang tidak spesifik seperti keletihan dan rasa loya. Selepas eraman untuk jangkamasa 60 hari, pesakit yang dijangkiti secara akut akan menunjukkan kenaikan paras enzim alanina aminotransferase (ALT) pada serumnya dengan paras puncaknya 600 IU/L. Simtom-simtom dan tanda-tanda yang ditunjukkan adalah sama dengan hepatitis virus akut yang lain serta kurang serius daripada infeksi hepatitis B (Locarnini, 1994).

Kegagalan hepatic fulminan (Fulminant Hepatic Failure; FHF) akibat daripada HCV adalah jarang, kebanyakan kes-kes hepatitis NANB FHF adalah disebabkan oleh agen-agen yang lain daripada HCV (Liang *et al.*, 1993; Fagan, 1994).

### 1.2.1 (c) Infeksi Kronik

Daripada kajian lepas, terdapat peratusan yang tinggi (lebih daripada 70%) infeksi hepatitis C bertukar kepada keadaan pembawa kronik (Alter, 1994) yang kebanyakan kes-kesnya adalah asimtomatik (Locarnini, 1994). Jika simptom berlaku, ia adalah tidak spesifik dan tidak berhubung secara nyata dengan fasa akut penyakit tersebut.

Simtom-simtomnya adalah keletihan yang sederhana hingga tenat dan kesakitan atau ketidakselesaan pada sukuan kanan bahagian atas abdomen. Jaundis, demam, kesejukan atau berpeluh malam, masalah penumpuan, pening kepala dan rasa loya mungkin berlaku. Peningkatan paras enzim alanina amino-transferase (ALT) dan enzim aspartat amino-transferase (AST) adalah biasa dan mungkin berlanjutan untuk beberapa tahun semasa infeksi akut memasuki keadaan kronik. Bagaimanapun, paras enzim tersebut boleh berubah-ubah dan kadang-kala mungkin berada pada julat normal (Locarnini, 1994).

Corak paras ALT mungkin boleh dijadikan sebagai penanda prognostik untuk perkembangan kepada keadaan kronik; hepatitis C kronik berlaku pada 42% daripada pesakit dengan kenaikan ALT yang sementara, 87% daripada pesakit dengan paras ALT yang berubah-ubah dan 95% daripada pesakit dengan kenaikan ALT yang kekal (Takeda *et al.*, 1979). Ketidakhadiran antibodi HCV dapat dilihat pada 10% daripada hepatitis C yang kronik walaupun terdapat RNA HCV dan bukti penyakit hati (Trepo *et al.*, 1993).

Infeksi HCV kronik pada dewasa boleh dikaitkan dengan kecederaan hepatik yang nyata samada simtomnya hadir atau tidak. Biopsi hati daripada pesakit-pesakit hepatitis C kronik menunjukkan suatu peratus hepatitis C kronik aktif (35%) dan kirroshosis (20%) yang

tinggi (Mattsson *et al.*, 1989; Hopf *et al.*, 1990). Korelasi antara magnitud kenaikan ALT dan darjah aktiviti histologi adalah selalu rendah. Cara infeksi samada parenteral atau sporadik tidak mempengaruhi infeksi HCV (Alter *et al.*, 1975). Infeksi HCV yang berterusan mungkin disebabkan oleh kehadiran HCV di dalam kawasan ekstrahepatik seperti limfosit darah perifer (Hsieh *et al.*, 1992).

Dipercayai bahawa virus tersebut berada dalam darah pada paras yang rendah sehingga kadang-kala kurang daripada paras pengesanan. Kerosakan hati yang ditentukan dengan biopsi hati mungkin berlaku secara beransur-ansur, tetapi pada masa tertentu hitungan virus dan paras ALT tidak membayangkannya (Locarnini, 1994).

Adalah dijangka bahawa 25-30% individu dengan infeksi kronik HCV akan mengalami kirroshosis selepas jangkamasa purata dua puluh tahun selepas menghubungkan replikasi paras rendah virus dengan kecederaan hati. Hepatoselular karsinoma dan kegagalan hati akan berlaku pada 77% daripada mereka yang mengalami kirroshosis (Choo *et al.*, 1990).

#### **1.2.1 (d) Hakikat daripada Infeksi HCV**

Kajian terkini melaporkan bahawa infeksi kronik akan berlaku pada 50% daripada pesakit hepatitis C post-transfusi; lebih kurang 25% daripada individu ini akan berkembang kepada kirroshosis. Titer RNA HCV serum akan menaik secara selari dengan keseriusan kerosakan hati pada pesakit yang mengidapi hepatitis C kronik. Pertemuan itu mencadangkan bahawa kadar replikasi HCV yang tinggi adalah berkaitan dengan perkembangan penyakit hati (Hagiwara *et al.*, 1993).



Antibodi tertentu terhadap protein-protein HCV (anti-HCV) yang merupakan asas untuk ujian terkini, wujud bersama dengan virus itu dan tidak bersifat meneutrasikan. Perkembangan HCV dan kekurangan tindakbalas imunologi terhadapnya adalah akibat daripada mutasi yang berlaku pada suatu kawasan glikoprotein empulur virus yang menyebabkan penghasilan pelbagai kuasispesies HCV. Mutasi tersebut berlaku akibat daripada pemilihan imun yang cepat pada varian suatu epitop di dalam suatu kawasan glikoprotein utama (Kumar *et al.*, 1994).

Daripada hasil kajian biopsi hati dua pesakit HCV, RNA HCV dijumpai walaupun mereka tidak mempunyai keabnormalan histologi yang ketara. Pertemuan ini menyokong konsep bahawa kerosakan hati yang kelihatan pada infeksi HCV kronik adalah akibat daripada reaksi imun perumah terhadap hepatosit yang telah diinfeksi dengan virus (Nouri-Aria *et al.*, 1993). Tanggungjawab imuniti perumah pada kecederaan hati di dalam individu yang diinfeksi oleh HCV juga disokong oleh kes di mana terdapatnya hepatitis kronik pada pesakit yang HCV-RNANYA positif tetapi paras ALTnya normal (Nouri-Aria *et al.*, 1993) dan pembawa HCV kronik dengan paras ALT dan histologi yang normal (Brillanti *et al.*, 1993).

Infeksi HCV kronik adalah selalu senyap iaitu perkembangan daripada fasa akut kepada penyakit hati yang serius tanpa sebarang simptom (Alberti *et al.*, 1992; Koretz *et al.*, 1993; Merican *et al.*, 1993). Perkembangan kepada hepatitis kronik tidak boleh dijangka dengan cara klinikal, epidemiologi atau biokimia. Oleh itu, penjagaan rapi adalah penting untuk semua individu yang terinfeksi.

Hepatoselular karsinoma (HCC) adalah salah satu akibat daripada kecederaan hati yang kronik. Ia merupakan salah satu kanser yang lazim menyebabkan kematian di dunia. Sejak penggunaan ujian serologi untuk HCV, suatu peratusan HCV yang tinggi dijumpai pada pesakit HCC; kejadian tersebut berlaku antara 30 hingga 75% di dunia (Colombo *et al.*, 1989; Kew *et al.*, 1990; Tarao *et al.*, 1994). Bukh *et al.* (1993a) telah menjumpai RNA HCV dengan penggunaan ujian PCR yang sensitif di dalam 26 (20%) daripada 128 pesakit HCC yang tidak dipilih.

Adalah dijangkakan bahawa jangkamasa dari pendedahan kepada HCV sehingga diagnosis HCC adalah 30 tahun. Oleh itu, pesakit yang diinfeksi dengan HCV sejak awal kehidupan mempunyai kebarangkalian yang tinggi untuk mengidap HCC akibat daripada jangkamasa pendedahan yang lama. Selain itu, pesakit yang mengalami kirroshis juga mempunyai risiko yang tinggi untuk mengidapi HCC (Nowicki dan Balistreri, 1995).

### **1.2.2 Rawatan Infeksi HCV**

Tujuan utama rawatan adalah untuk menghapuskan HCV dan mencegah kecederaan hepatik yang berterusan. 'Acyclovir' dan 'corticosteroids' didapati tidak efektif (Pappas *et al.*, 1985; Stokes *et al.*, 1987). Pada kebelakangan ini, hasil yang paling berjaya adalah dengan penggunaan terapi 'alpha-interferon' ( $\alpha$ -IFN).

Interferon adalah sitokin semulajadi yang mempunyai ciri-ciri antivirus dan imunomodulatori (Locarnini, 1994). Ia merencat spektrum luas virus termasuk HCV. Daripada pesakit-pesakit yang telah dirawat, lebih kurang 50 - 60% pada mulanya bertindakbalas dengan menormalisasikan paras ALT tetapi sebahagian daripadanya jatuh

sakit semula sebaik sahaja rawatan dihentikan.. Ia mungkin kerana interferon mengurangkan dan bukan menghapuskan virus tersebut. Hanya 20-25% daripada mereka mengalami respon yang berterusan (Nowicki dan Balistreri, 1995).

Hampir 80% daripada pesakit yang sakit semula akan memberi respon kepada terapi  $\alpha$ -IFN yang kedua. Penanda respon secara jangka panjang termasuk ketidakhadiran kirroshosis, jangkamasa infeksi yang pendek, titer virus yang rendah dan kekurangan strain viral tertentu (jenis II yang rendah, jenis I yang tinggi) (Perrillo, 1992). Reichard *et al.* (1994) telah mencadangkan suatu jangka rawatan yang panjang (seperti 60 minggu) boleh menggalakkan kadar respon yang berterusan dan penghapusan replikasi virus yang tinggi.

Kajian terkini menyatakan bahawa genotip virus dan titer virus mungkin menjadi ramalan baik untuk menentukan tindakbalas interferon (Davis dan Lim, 1993). Kesan sampingan selepas terapi melibatkan sindrom akut yang berkaitan dengan dos yang diberikan seperti kesakitan dan selsema (Viladomiu *et al.*, 1992) dan kadang-kala ketoksikan yang lebih serius termasuk penindasan sum-sum tulang, ketoksikan neuro dan komplikasi psikiatri (McDonald *et al.*, 1987).

Kajian percubaan terkini menunjukkan bahawa pesakit hepatitis C kronik akan memberi respon yang baik kepada rawatan jika mereka diinfeksi oleh HCV genotip tertentu atau jika paras RNA HCV di dalam serum adalah rendah. Baru-baru ini, terdapat lebih bukti yang menyatakan bahawa paras genom adalah penanda yang baik bagi respon infeksi terhadap terapi interferon dan bukan genotipnya (Hess, 1994). Teknik-teknik yang sensitif telah menunjukkan RNA HCV hilang daripada serum pesakit yang memberi respon terhadap terapi interferon (Di Bisceglie *et al.*, 1989). Pada pesakit yang memberi

respon pada jangka masa panjang selepas infeksi HCV didapati antibodi terhadap NS3 telah berkurangan selepas virus HCV dihapuskan. Tambahan pula, paras IgM anti-HCV menjadi negatif. Beberapa tahun selepas respon terhadap terapi interferon yang berjaya, anti-HCV mungkin menjadi negatif, ia mencadangkan bahawa virus telah dihapuskan.

### **1.3 PENYIASATAN MAKMAL UNTUK PENGESANAN HCV**

#### **1.3.1 Transkripsi Berbalik-Tindakbalas Rantaian Polimerase (RT-PCR)**

Perkembangan teknik tindakbalas rantaian polimerase (PCR) telah membenarkan pengesanan RNA HCV di dalam serum pesakit-pesakit terinfeksi dan menunjukkan infeksi yang aktif. Ujian PCR adalah suatu ujian yang sensitif dan spesifik untuk pengesanan jujukan gen HCV di dalam spesimen di mana suatu bahagian pendek genom HCV akan diamplifikasikan berjuta-juta kali kepada paras yang boleh dikesan dengan senang. Proses amplifikasi PCR ini memerlukan banyak langkah dan adalah kompleks secara teknikal serta menggunakan reagen yang mahal. Namun begitu, maklumat yang diperolehi daripada ujian ini sangat berguna di dalam pencirian dan pengawalan perkembangan infeksi HCV (Locarnini, 1994).

Jika jujukan gen HCV dapat dikesan dengan PCR, ini bererti pesakit itu mempunyai paras HCV di dalam darahnya yang dapat dikesan. Jika jujukan gen adalah tidak dapat dikesan, ia bererti samada pesakit itu telah menghapuskan virus itu daripada badan dan keadaan pembawa kronik belum berlaku atau paras virus di dalam darah adalah sangat rendah hingga ia di bawah paras pengesanan PCR. Walaubagaimanapun, di dalam

keadaan pembawa kronik, paras HCV boleh berubah-ubah di atas dan di bawah paras pengesanan HCV-PCR (Locarnini, 1994).

Walaupun PCR bukan sentiasa digunakan untuk pengesanan keadaan pembawa yang kronik, ia adalah berguna untuk:-

- a. mengevaluasi terapi antivirus,
- b. mengesan cara-cara transmisi,
- c. membezakan antibodi pasif daripada infeksi aktif (neonat),
- d. membenarkan diagnosis awal sebelum serokonversi,
- e. mendefinisikan keadaan antibodi hepatitis C yang tidak ditentukan (indeterminate anti-HCV antibody result) atau serum bermasalah,
- f. membenarkan diagnosis pembawa kronik,
- g. mengidentifikasikan viremia di dalam pesakit-pesakit yang anti-HCV negatif,
- h. mengesan HCV di dalam produk-produk darah (Locarnini, 1994).

Suatu hasil ujian serologi yang antibodi HCV positif hanya menunjukkan bahawa pesakit itu telah didedahkan kepada HCV tetapi ujian itu tidak boleh membezakan antara fasa akut, kronik atau infeksi telah dihapuskan. RNA HCV di dalam serum itu mungkin boleh dikesan oleh PCR tiga minggu selepas pendedahan dan mungkin berguna untuk tujuan diagnosis di dalam jangkamasa tingkap sebelum serokonversi iaitu lebih kurang dua hingga tiga bulan selepas pendedahan, apabila sangkaan klinikal tentang infeksi HCV adalah kuat (Locarnini, 1994).

Walaupun ujian pengesanan PCR adalah suatu alat untuk diagnosis infeksi yang penting, ia juga mempunyai kelemahannya yang tertentu. Kesensitifan keterlaluan bagi

PCR berangkaian menambahkan risiko kontaminasi dan hasil positif palsu. Tambahan pula, pengkuantitian RNA HCV dengan kaedah PCR adalah rumit. Namun begitu, dengan penggunaan kawalan yang sesuai dan menjalankan ujian dengan langkah berjaga-jaga yang ketat, kontaminasi boleh dikawal. Selain itu, kebanyakan daripada kelemahan PCR dapat diatasi dengan teknik-teknik seperti PCR berangkaian tiub tunggal, 'thermal cycler' yang mengandungi 96 lubang untuk bilangan yang lebih banyak digunakan dan pengesanan produk PCR dengan teknologi EIA yang teradaptasi (Breschkin *et al.*, 1993).

Infeksi HCV adalah diikuti dengan jangkamasa eraman yang panjang akibat daripada serokonversi terlambat. Ini menghadkan utiliti ujian pengesanan 'enzyme-linked immunoabsorbant assay' (ELISA) semasa fasa akut penyakit HCV. Tambahan pula, variasi genomik HCV boleh mengurangkan kadar pengesanan dengan cara anti-C100 ELISA dan 'recombinant immunoblot assay' (RIBA) (Alter *et al.*, 1989; Kuo *et al.*, 1989). Pengesanan HCV di dalam serum atau plasma dengan kaedah transkripsi berbalik - tindakbalas rangkaian polimerase (RT-PCR) telah dijalankan oleh beberapa kumpulan penyelidik selepas terdapatnya informasi jujukan genomik HCV. RT-PCR telah digunakan untuk mengesan RNA virus semasa fasa akut penyakit dan semasa ketidakhadiran antibodi anti-HCV (Weiner *et al.*, 1990). RNA virus merupakan suatu prediktor jangkitan yang tepat (Garson *et al.*, 1990).

### **1.3.2 Analisis Penyerapan 'Southern'**

Ramai penyelidik telah menggunakan analisis penyerapan 'Southern' sebagai satu kaedah untuk memperbaiki kesensitifan dan kespesifikan terhadap gel agaros yang berendam dengan etidium bromida. Namun begitu, kaedah penghibridan cecair (LH)

(Ulrich *et al.*, 1990) dan analisis penyerapan Slot (Nakao *et al.*, 1991) memberi kesensitifan yang serupa dan LH juga memberi lebih kespesifikan. Kebaikan format LH dalam makmal klinikal termasuk:-

- a. ia lebih spesifik daripada elektroforesis gel agaros rendaman etidium bromida,
- b. prosesnya lebih mudah kerelatifannya dan
- c. ia menghasilkan nisbah isyarat yang lebih tinggi (Abbott *et al.*, 1988)

tanpa penggunaan PCR bersarangan dan masalah warisan akibat daripada pembawaan ke hadapan.

### **1.3.3 Kaedah Serologi / ELISA**

Penemuan sebahagian daripada bahan genetik HCV pada 1988 dengan teknologi DNA rekombinan telah menyebabkan penghasilan ujian-ujian yang mengesan antibodi spesifik. Ujian EIA yang pertama telah dihasilkan pada 1989 di mana ia menggunakan protein rekombinan yang tunggal untuk mengesan antibodi dan ia memberi perkadaran hasil positif dan negatif palsu yang ketara. Kemudian, penghasilan ujian antibodi generasi kedua yang melibatkan lebih banyak antigen telah memperbaiki kesensitifan dan kespesifikan pengesanan antibodi serta membantu pengesanan antibodi spesifik lebih awal dalam jangkamasa jangkitannya (Locarnini, 1994).

Masa untuk serokonversi adalah sangat berbeza tetapi biasanya adalah lapan hingga dua belas minggu selepas pendedahan. Dalam kes akut antibodi mungkin dikesan pada satu hingga enam minggu selepas simptom dihasilkan (Wang *et al.*, 1992a). Dalam individu yang imunokompromi, sistem antibodinya mungkin lemah atau tidak dihasilkan langsung. Pada lazimnya, respon antibodi adalah berlanjutan. Antibodi hepatitis C

tersebut masih belum diketahui samada ia dapat memberi imuniti terhadap infeksi yang seterusnya. Kajian awal telah menunjukkan bahawa selepas jangkitan akut hepatitis C, pencabaran semula dengan jenis HCV yang sama menyebabkan jangkitan semula (Abe *et al.*, 1992; Prince *et al.*, 1992). Kajian tersebut adalah tidak menggalakkan bagi penghasilan vaksin kerana penghasilan vaksin bergantung kepada stimulasi antibodi ketahanan.

Daripada kit pengesanan yang sedia ada, kesensitifannya untuk mengesan individu-individu yang telah dijangkiti hepatitis C adalah lebih kurang 90%. Beberapa individu yang positif mungkin tidak dikesan kerana jangkamasa tingkap antara jangkitan dari serokonversi. Serum yang mengandungi antibodi HCV yang tidak pasti, biasanya memberi bacaan kepadatan optikal (O.D.) di dalam EIA yang berhampiran dengan nilai 'cut-off'. Ini mungkin disebabkan oleh interaksi yang tidak spesifik dengan kontaminasi yang dibersihkan bersama dengan antigen rekombinan di dalam ujian itu.

Satu set protein rekombinan telah digunakan untuk mengenalpasti terhadap HCV yang berada dalam serum individu-individu yang mempunyai infeksi HCV terkini atau yang lalu. Kebanyakan daripada pesakit mengandungi antibodi terhadap komponen teras, bahagian NS3, 4 dan 5 (Garson dan Tedder, 1993). Antibodi terhadap komponen empulur HCV adalah sentiasa dikenalpasti jika antigen glikosilat empulur virus digunakan. Rajah 1.5 menunjukkan komposisi ujian berlainan yang dihasilkan untuk pengenalpastian HCV. Terdapat juga pesakit yang hanya mengandungi antibodi terhadap salah satu daripada protein tersebut. Antara individu yang mengalami tekanan imuno, terdapat pesakit yang hanya mempunyai antibodi terhadap bahagian NS5 atau E1E2 (Alter, 1992). Selain itu,